胭脂萝卜花青素提取及对NCI-N87细胞增殖侵袭的影响

梁姗，蒋子川，冯均

(长江师范学院生命科学与技术学院，重庆 408100)

摘要：为研究胭脂萝卜花青素的提取工艺，考察了液料比、浸提温度、浸提时间、超声功率、超声时间对花青素提取率的影响。采用MTT实验、细胞侵袭实验研究了花青素对人胃癌细胞NCI-N87增殖、侵袭的作用，进一步用免疫印迹分析其对HER2信号通过的影响。结果表明，结合响应面分析得出胭脂萝卜花青素最佳提取工艺为：以1%盐酸乙醇为提取剂，液料比10:1，40℃浸提2h，400w超声波破碎15min，在此条件下，花青素的最高提取量为3.92mg/g。30μg/mL的胭脂萝卜花青素能显著抑制NCI-N87细胞的增殖和侵袭能力，同时抑制HER2蛋白及Akt的磷酸化水平。

关键词：胭脂萝卜；花青素；细胞增殖；细胞侵袭

The effect on NCI-N87 Cell Proliferation and Invasion by Carmine Radish Anthocyanin

Liang Shan，JIANG Zi-chuan，Feng Jun

（College of Life&Tech, Yangtze Normal University, 408100, Chongqing,China）

Abstract: To explore the extraction technology of anthocyanin from carmine radish, five single factors were studied including solid-liquid ratio, digestion temperature, digestion time, ultrasonic power, and ultrasonic power. MTT and transwell™ were used to discuss the proliferation, invasion ability of human gastric carcinoma cells（NCI-N87）which effect by anthocyanin from carmine radish. Furthermore, western blot used to analyze the HER2 pathway. The optimum extraction technology was determined based on response surface analysis: 1% acid-ethanol as extracting agent, 1:10 solid-liquid ratio, digestion 2h at 40℃ with 400w ultrasonic disruption for 15min. Under this condition, anthocyanin extraction content was 3.92mg/g. 30μg/mL anthocyanin from carmine radish inhibited NCI-N87 cell proliferating and invasion ability, decreased HER and p-Akt expression.

Key words: carmine radish；anthocyanin；cell proliferation；cell invasion

[1]

花青素是存在于植物液泡中的黄酮类化合物，天然花青素可分为矢车菊素（cyanidin）、天竺葵素（anthocyanin）、飞燕草素（delphinidin）、芍药素（peonidin）、锦葵花素（malvidin）以及牵牛花素（petunidin）[1]。研究表明，花青素具有一定的抗肿瘤活性，主要机制是作用于丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-activated protein

[1] 1）收稿日期与修回日期；

2）基金来源：重庆市教委基金（KJ1601207）；

3）电子信箱：vmm420@hotmail.com。

kinase，MAPK）和磷脂酰肌醇3-激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶（Phosphatidylinositol-3-kinase-serine/threonine kinase，PI3K-Akt）途径，抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭，促进细胞凋亡[2-4]。胃癌是来自于上皮的恶性肿瘤，其中20%胃癌为人类表皮生长因子受体2（Human epidermal growth factor receptor 2，HER2）过表达型。胭脂萝卜（Carmine radish）为重庆涪陵特色蔬菜，富含花青素，其中95%为天竺葵素[5-8]。本研究建立了超声波辅助提取胭脂萝卜花青素的最佳工艺，分析其对胃癌细胞株NCI-N87的增殖和侵袭能力的影响，并探讨其对HER2信号通路相关蛋白的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

胭脂萝卜　胭脂红 1 号；NCI-N87　美国 ATCC 细胞库；胰蛋白酶（≥180 units）、牛血清蛋白（bovine serum albumin，BSA）、ECL 显影液　Millipore 公司；蛋白 Marker、磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）、磷酸盐缓冲液（PBS）TaKaRa 公司；PVDF 膜、Tris-HCl （pH 6.8，pH 8.8）、十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）溶液、ACR（丙烯酸脂共聚物）溶液、结晶紫　Bio-Rad 公司；RPMI1640 培养基　Hyclone 公司；MTT 试剂盒（C0009）、HER2（AF0177）　碧云天公司；兔抗 AKT（380617）、兔抗 p-AKT（Ser473）（381555）、兔抗 GADPH（380626）、辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase，HRP）标记的山羊抗兔二抗（511201）　正能生物公司；其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

GelDoc XR+凝胶成像系统　美国 Bio-Rad 公司；TS100 相差倒置显微镜　日本 Nikon 公司。MK3 酶标仪　美国 Thermo 公司；JY98-Ⅱ超声波细胞粉碎机　宁波新芝公司；T6 紫外-可见分光光度计　北京普析公司。

1.2 方法

1.2.1 超声波辅助提取花青素

胭脂萝卜切片，60℃烘干到恒重，粉碎并过 40 目筛，避光常温保存。称取胭脂萝卜粉 1.0g，以 1%盐酸乙醇为浸提剂，调节液料比，在一定温度下浸提，随后用不同功率和时间的超声进行处理，旋转蒸发仪去除液体，以去离子水溶解花青素并测定含量 [9]：

$$p(mg/g)=\frac{(A0-A1)\times V\times n\times M}{\varepsilon\times m}$$

式中：p 为花青素含量（*mg/g*）*A*0 和 *A*1 分别 pH1.0、pH4.5 时花青素在 520nm 处的吸光度；*V* 为提取液总体积（mL）；*n* 为稀释倍数；*M* 为天竺葵素-3-槐二糖苷相对分子量（648.5）；ε为消光系数（30200）；*m* 为样品质量（g）。

1.2.2 单因素试验设计

分别探究液料比例：5:1、10:1、15:1、20:1、25:1；浸提温度：20℃、30℃、40℃、50℃、60℃；浸提时间：1h、1.5h、2h、2.5h、3h；超声功率：100w、200w、300w、400W、500w；超声时间：5min、15 min、25min、35min、45min 对胭脂萝卜花青素提取量的影响。

1.2.3 响应面法试验设计

根据单因素试验结果，以浸提时间（A）、超声功率（B）、浸提温度（C）这 3 个因素为自变量，以胭脂萝卜花青素提取量为响应值，进行对提取胭脂萝卜花青素条件的优化，因素水平表见表 1。

表 1　因素与水平

Table1 Factors and levels

水平	因素		
	浸提时间（A）/h	超声功率（B）/w	浸提温度（C）/℃
-1	1.5	300	30
0	2.0	400	40
1	2.5	500	50

1.2.4 大孔树脂纯化花青素

在层析柱中加入预处理好的 AB-8 大孔树脂，加入花青素提取液，以 1%盐酸乙醇进行解析，收集滤液，用旋转蒸发仪在 40℃回收乙醇，得到花青素纯化液。

1.2.5 细胞培养

NCI-N87 细胞购自于美国 ATCC 公司，于本实验室保存。采用添加 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，在 37℃，5%CO_2 培养箱内培养，长至汇合度为 80%-90%时，用 0.25%胰蛋白酶消化并传代。

1.2.6 细胞 MTT 实验

根据碧云天公司细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒（C0009）说明书进行操作：在 96 孔板中，每孔加入 100μL 2000 个 NCI-N87 细胞，于 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中孵育 24h。以 0.1%DMSO 为对照组，实验组用不同浓度的花青素（10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL、40μg/mL），分别处理细胞 24h、48h、72h 后，每孔加入 10μL MTT 溶液（5mg/ml），在细胞培养箱内孵育 4h。每孔加入 100μL 溶解液，在细胞培养箱中继续孵育 4 小时。用酶标仪在 570nm 测定吸光度（*A* 值），实验重复 3 次，每次设 3 个平行样。

1.2.7 细胞侵袭实验

用 0.25%胰蛋白酶消化 NCI-N87 细胞，取 $5x10^4$ 个细胞加入 200μl 培养基培养于侵袭小室中，以 0.1%DMSO 为对照组，实验组加入不同浓度花青素（10μg/mL 、20μg/mL、 30μg/mL、 40μg/mL），将侵袭小室放置于 24 孔板中，24 孔板预先加入 700μl 细胞培养基。培养 12 小时后，取出侵袭小室，吸去培养基，用甲醛固定 15min，0.1%结晶紫染色 10min，用 PBS 清洗 3 次后，擦去小室外底部，置于倒置显微镜下，20 倍随机挑选 3 个视野，进行拍照并计数，实验重复 3 次。

1.2.8 免疫印迹检测蛋白表达

将 NCI-N87 细胞接种于 6 孔板中，细胞汇合率至 90%时，在实验组中加入不同浓度花青素（10μg/mL 、20μg/mL、 30μg/mL、 40μg/mL），以 0.1%DMSO 为对照组，孵育 24 小时后，消化并收集细胞，提取总蛋白并上样 50μg，200V SDS-PAGE 电泳分离，转膜封闭 1h 后，加入 HER2、p-Akt、Akt、GAPDH 一抗 4℃孵育过夜，二抗室温孵育 1h 后，ECL 显色，选取合适的曝光度进行成像分析。

1.2.9 统计学处理

所有实验数据以 $x±s$ 表示，应用 SPASS 22.0 统计软件对资料进行分析，两组均数间比较采用方差分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果讨论

2.1 花青素提取工艺

2.1.1 液料比对花青素提取量的影响

由图1可知，在低于10:1液料比时，更多的乙醇能增大与萝卜粉的接触面积，提高花青素的溶解力[10-11]。当料液比达到10:1后，随液料比的增加，花青素提取量反而下降增加，说明此时花青素的溶解力达到最大，再增加提取液用量既增加生产成本也不能获更高的提取量。因此，花青素提取液料比为10:1为宜。

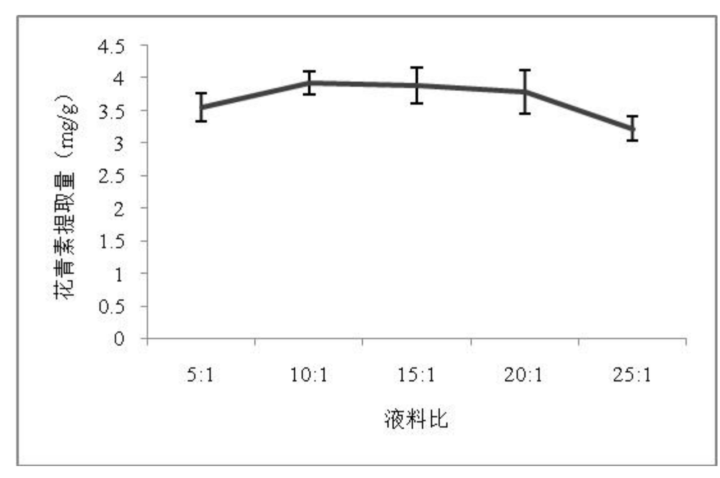


图 1 液料比对花青素提取量的影响

Fig. 1 Effect of solid-liquid ratio on anthocyanin content

2.1.2浸提时间对花青素提取量的影响

由图2可见，在2h之前，花青素提取量随浸提时间的延长而逐渐提高，在2h以后则开始下降。可能由于浸提时间过长，受外部环境因素的影响导致花青素降解，影响其提取量[11]，因此浸提时间在2 h左右为宜。

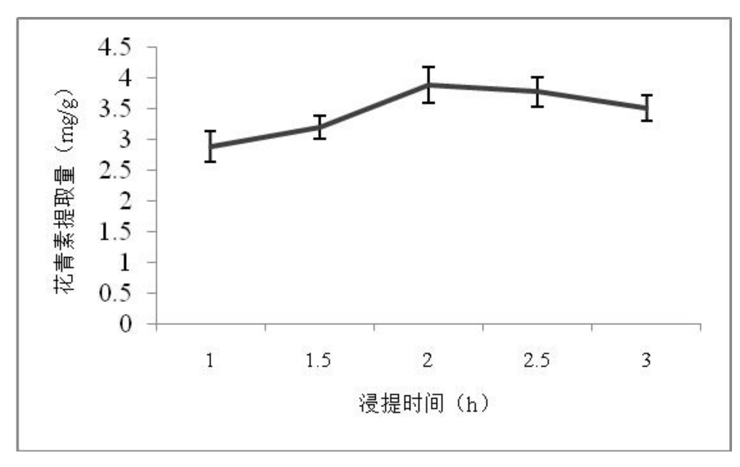


图 2 浸提时间对花青素提取量的影响

Fig.2 Effect of the digestion time on anthocyanin content

2.1.3 浸提温度对花青素提取的影响

由图 3 可见，浸提温度低于 40 ℃时，花青素的提取量随着温度升高而增高，当温度高于 40 ℃时，提取量明显降低。花青素的稳定性受温度影响较大，高温可以使其单体结构破坏 [12]，同时高温可能使胭脂萝卜的其它成分析出，影响花青素纯度。因此，胭脂萝卜中花青素的浸提温度选择 40℃为宜。

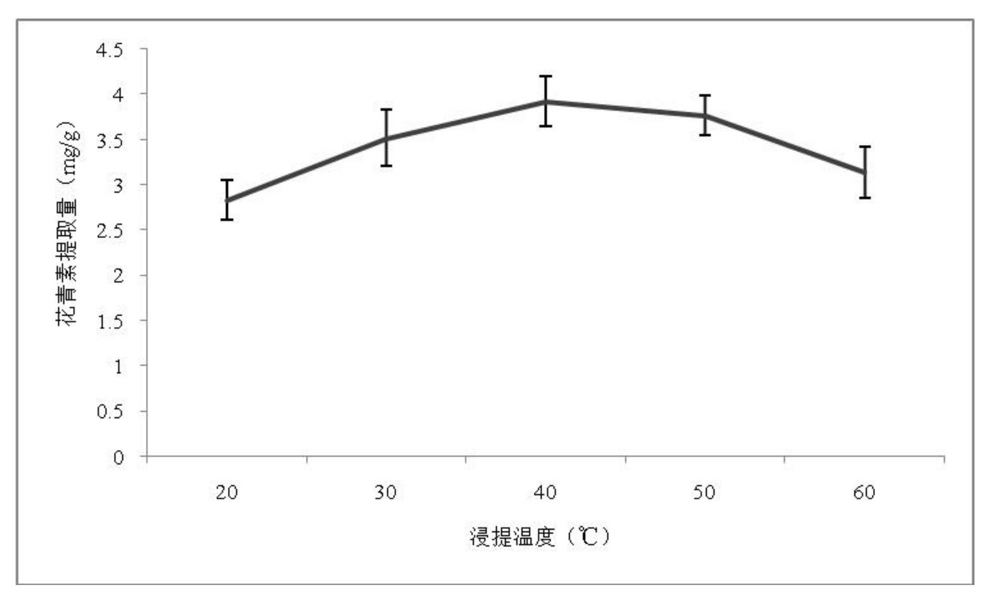


图 3 浸提温度对花青素提取量的影响

Fig.3 Effect of the digestion temperature on anthocyanin content

2.1.4 超声时间对花青素提取量的影响

由图4可见，超声持续时间对花青素提取量的影响较小，当超声时间为15min-25min时，花青素提取量最高，但继续延长时间，其提取量无明显上升。因此选择15min为超声时间。

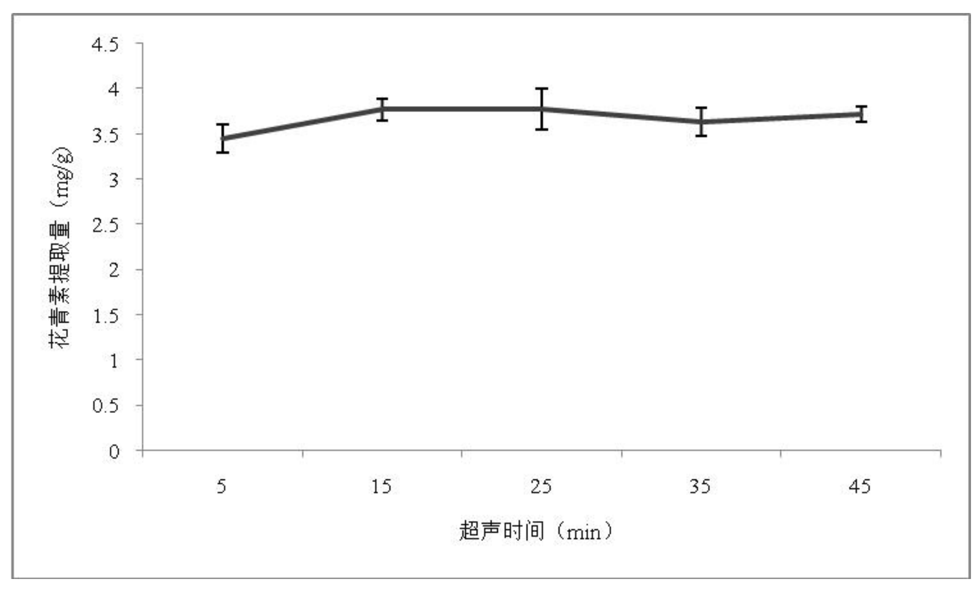


图 4 超声时间对花青素提取量的影响

Fig.4 Effect of the ultrasonic time on anthocyanin content

2.1.5 超声功率对胭脂萝卜花青素提取影响

由图5可见，随着超声功率的提高，花青素提取量也提高，当超声功率为400W时花青素含量最高。超声波功率过大时，非花青素成分溶解量可能增加，降低了花青素的提取量。因此提取胭脂萝卜花青素的超声波功率400W较为合适。

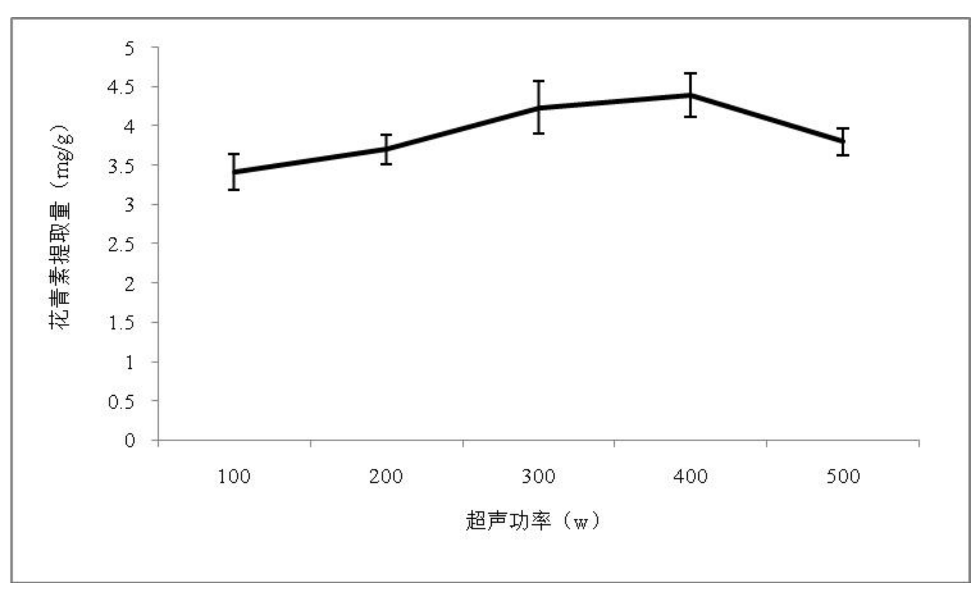


图 5 超声功率对花青素提取量的影响

Fig.5 Effect of the ultrasonic power on anthocyanin content

2.2 响应面优化实验结果

2.2.1 回归模型建立及显著性检验

基于单因素实验结果，选取浸提时间（A）、超声功率（B）、浸提温度（C）进行响应面实验，以筛选出最优化的组合。响应面实验结果见表 2（3 次重复），以花青素提取量（mg/g）为响应值（Y），使用软件 Design Expert 8.0 进行多元化回归分析，拟合出回归方程:Y=3.92+0.27*A-0.013*B+0.14*C-0.42*A2-0.098*B2-0.28*C2。

表 2　响应面分析方案及实验结果

Table2 Response surface analysis and results

试验号	A	B	C	提取量	
				实测值	预测值
1	-1	0	1	3.06	3.09
2	1	0	1	3.67	3.63
3	1	0	-1	3.35	3.36
4	-1	0	-1	2.81	2.81
5	1	-1	0	3.72	3.69
6	1	1	0	3.65	3.67
7	0	-1	1	3.67	3.69
8	0	-1	-1	3.45	3.42
9	0	1	1	3.67	3.66
10	0	1	-1	3.37	3.39
11	1	-1	0	3.65	3.69
12	-1	1	0	3.15	3.12
13	0	0	0	3.91	3.92
14	0	0	0	3.89	3.92
15	0	0	0	3.95	3.92
16	0	0	0	3.93	3.92
17	0	0	0	3.92	3.92

由方差分析结果（表3）可知，该回归方程（模型）的回归效果显著（P<0.0001），失拟项不显著（0.4164），该回归方程的效果显著，拟合程度好，有实际应用的意义。其中超声功率（B）对花青素提取量影响较不显著（P＞0.0001），剔除掉不显著项，进行优化可得$3.92+0.27*A+0.14*C-0.42*A^2-0.098*B^2-0.28*C^2$。

表 3 回归模型方差分析

Table3 Variance analysis of regression model

因素	总和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.785828	6	0.297638	301.3176	< 0.0001	*
A	0.483347	1	0.483347	489.3225	< 0.0001	*
B	0.00127	1	0.00127	1.286034	0.2832	
C	0.148513	1	0.148513	150.3485	< 0.0001	*
A^2	0.699204	1	0.699204	707.8481	< 0.0001	*
B^2	0.039002	1	0.039002	39.48399	< 0.0001	*
C^2	0.321414	1	0.321414	325.3878	< 0.0001	*
残差	0.009878	10	0.000988			
失拟项	0.005428	5	0.001086	1.219749	0.4164	
纯误差	0.00445	5	0.00089			
总和	1.795706	16				
R^2=0.9945						

注：*表示P<0.0001

2.2.2 响应面分析及提取条件优化

分析图 6 可知，浸提时间和浸提温度对花青素提取量影响较大。经响应面分析优化，从胭脂萝卜里提取花青素的最佳提取工艺为浸提温度 42.22℃，浸提时间 2.11h，超声功率 386.67W，在此条件下，花青素的提取量预测值最高为 3.976mg/g。为验证此理论条件的可行性，并考虑到实际操作的便利，将工艺参数修正为：浸提温度 40℃，超声功率 400W，浸提时间 2h。在此实验条件下进行 5 次实验，结果为 3.92mg/g，标准差为 0.0224mg/g，说明该优化工艺所得试验结果稳定，优化提取条件可靠。

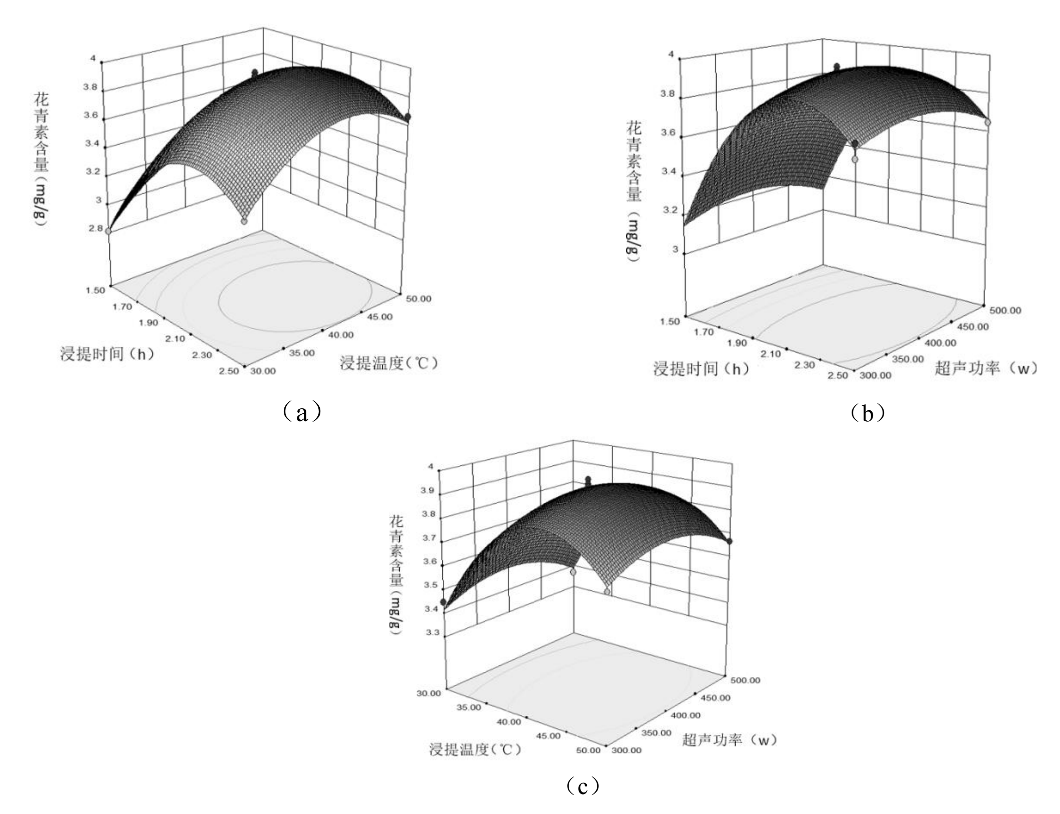


图 6 响应面分析结果（a：浸提时间和浸提温度；b：浸提时间和超声功率；c：浸提时间和超声功率）

Fig.6 Response surface analysis（a：digestion time and temperature；b：digestion time and ultrasonic power；c: digestion time and ultrasonic power）

2.3 花青素抑制胃癌细胞NCI-N87增殖及侵袭

2.3.1 花青素抑制 NCI-N87 细胞增殖

已报道来源于果蔬的花青素粗提物及纯品均能抑制多种肿瘤细胞的增殖[13-14]。MTT实验结果表明（表4），10μg/mL花青素对细胞增殖无显著影响，20μg/mL、30μg/mL、40 μg/mL花青素均能抑制细胞增殖，30μg/mL与40 μg/mL与对照组相比差异显著（P<0.05），30μg/mL与40 μg/mL相比差异不显著，说明30μg/mL胭脂萝卜花青素对细胞增殖有较显著的抑制效果。

表 4　花青素对 NCI-N87 细胞增殖的影响（平均值±s）（*吸光度*）

Table4 Effects of anthocyanin on the proliferation of NCI-N87（mean value±s）（*A*）

组别	24 h	48 h	72 h
对照	1.02±0.11	1.05±0.12	1.08±0.11
10μg/mL	0.92±0.08	0.94±0.10	0.96±0.11
20μg/mL	0.78±0.09*	0.80±0.10*	0.82±0.08*#
30μg/mL	0.65±0.07*	0.66±0.06*#	0.68±0.05*#Δ
40μg/mL	0.63±0.06*	0.61±0.08*	0.70±0.07*#

注：*表示与对照组相比 P<0.05；#表示与 24h 同剂量组 P<0.05；Δ表示与 48h 同剂量组 P<0.05.

2.3.2 花青素抑制 NCI-N87 细胞侵袭

细胞侵袭实验结果显示（图 7 与图 8），随着花青素处理浓度的增强，细胞侵袭能力逐渐下降。10μg/mL 与 20μg/mL 处理组与对照组差异不显著，30μg/mL 与 40μg/mL 与对照组相比差异显著（P<0.05），30μg/mL 与 40μg/mL 处理组的之间的抑制能力差异不显著，说明 30μg/mL 花青素对细胞侵袭已有较显著的抑制效果。

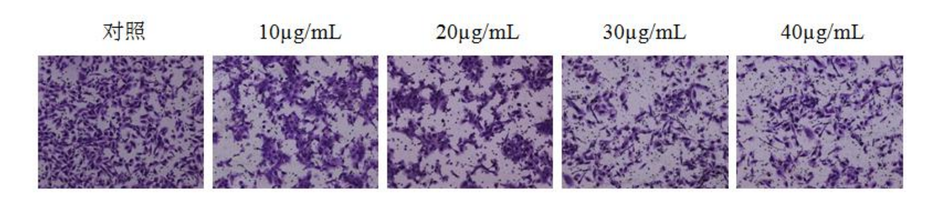


图 7 花青素对 NCI-N87 细胞侵袭能力的影响

Fig.7 Effects of anthocyanin on the invasion of NCI-N87

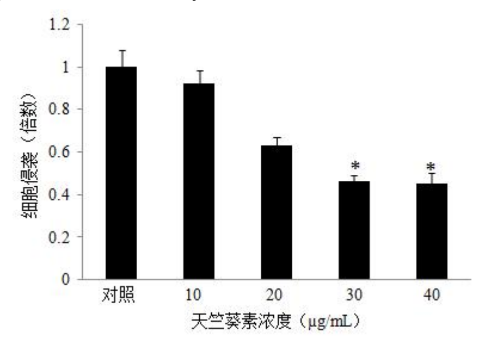


图 8 花青素对 NCI-N87 细胞侵袭的统计分析

Fig.8 Statistic analysis of anthocyanin on the invasion of NCI-N87

注：*表示与对照组相比 P<0.05

2.3.3花青素对HER2信号通路的抑制

HER2蛋白是具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜蛋白，属于表皮生长因子受体（Epidermal growth factor receptor，EGFR）家族成员，可通过磷酸化下游Akt蛋白，诱导肿瘤的发生及转移[15-16]。花青素能通过抑制HER2及下游信号从而抑制HER2高表达的乳腺癌细胞株(BT474、MDA-MB-231、MCF-7)的迁移和侵袭能力[17-18]。本研究中通过蛋白印迹分析花青素对HER2及下游Akt蛋白表达发现（图9），10μg/mL花青素处理组的HER2、p-Akt蛋白表达无显著差异；20μg/mL、30μg/mL、40μg/mL花青素处理使HER2、p-Akt均受到抑制，Akt蛋白的表达均无显著差异。提示胭脂萝卜花青素抑制HER2高表达胃癌NCI-N87细胞的侵袭可能与HER2蛋白表达水平和Akt的磷酸化表达密切相关。

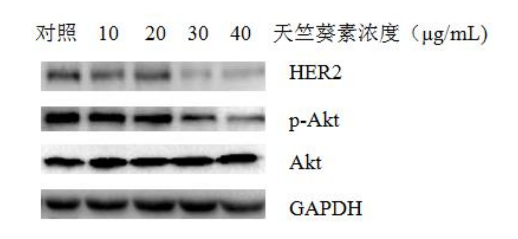


图 9 花青素对 HER2 及 Akt 蛋白表达的影响

Fig. 9 Effects of anthocyanin on the HER2 和 Akt expression

3 结论

本研究采用Box.Behnken的中心组合设计及响应面分析，建立了超声波提取胭脂萝卜花青素提取的二次多项式数学模型。经检验证明该模型是合理可靠的，能够优化胭脂萝卜花青素提取量。超声波辅助提取胭脂萝卜花青素最佳工艺参数为：以1%盐酸乙醇为提取剂，液料比10:1，浸提温度40℃，超声功率400W，浸提时间2h，花青素提取量最高为3.92mg/g。进一步研究经AB-8大孔树脂纯化后的花青素抗肿瘤活性发现，30μg/mL胭脂萝卜花青素对胃癌细胞NCI-N87的增殖和侵袭均有一定的抑制作用，且降低了HER2以及磷酸化Akt蛋白的表达，说明胭脂

萝卜花青素可以通过HER2-Akt信号途径抑制HER2阳性胃癌细胞增殖的和侵袭。进一步利用肿瘤移植小鼠模型，分离胭脂萝卜中主要成分天竺葵素，探讨其是否具有更高效的抑制肿瘤细胞增殖和侵袭的作用，能为此品种花青素产品的开发作为理论支持。

参考文献

[1]JEONG J W，LEE W S，SHIN S C，et al．Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF-κB and Akt/MAPKs signaling pathways[J]．International Journal of Molecular Sciences， 2013，14（1）：1502-1515．
[2]SHIN D Y，LEE W S，LU Jingnan，et al．Induction of apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells by anthocyanins through suppression of Akt and activation of p38-MAPK[J]．International Journal of Oncology，2009，35（6）：1499-1504．
[3]OAK M H，BEDOUI J E，MADERIRA S V F，et al．Delphinidin and cyanidin inhibit PDGFAB-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK[J]． British Journal of Pharmacology，2006，149（3）：283-290．
[4]HUANG Huipei，SHIH Y W，CHANG Y C，et al．Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/PI3K pathway[J]．Journal of Agricultural and Food Chemistry，2008，56（19）：9286-9293．
[5]时建伟，腾晓旭，曹团武.涪陵胭脂萝卜红色素的提取、分离及精制研究进展[J]. 广州化工，2016，2：6-7.
[6]茹克娅，沙吾提，赵丽凤．涪陵胭脂萝卜红色素的提取与分析[J]．喀什师范学院学报，2005，26（3）：61-63．
[7]梁姗，蒋子川，杨霞，等．高效液相色谱法测定胭脂萝卜中天竺葵素含量[J]．广州化工，2017，45（7）：92-93．
[8]巴都马拉. 超声波辅助提取红心萝卜花色苷的研究[J]. 食品安全导刊, 2015，33:135-138.
[9]宋德群，孟宪军，王晨阳，等．蓝莓花色苷的 pH 示差法测定[J]．沈阳农业大学学报，2013，44（2）：231-233．
[10]芮春梅，李成琼，司军．胭脂萝卜红色素提取的原理和方法[J]．南方农业，2007，1（1）：71-72．
[11]阳晖，曾召银．超声波辅助法提取胭脂萝卜色素的工艺研究[J]．食品工业科技，2012，33（24）：325-327．
[12] 陈剑波，邝守敏，孟巨光．微波法提取萝卜红色素的工艺研究[J]．粮油加工，2008，3：124-126．
[13] Li Y W，Wang D，Li X G，et a1．Anthocyanins extractedfromChinose blueberry and its antieancer effects on HepG2 cells[J]，Advanced Materials Research，2014，2989（887）：592-595
[14] A Johnson S，H Arjmandi B．Evidence for anti-cancer properties of blueberries：a mini-review[J]．Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry，2013，13（8）：1142-1144
[15] Lordick F，Al-Batran S E，Dietel M，et al. HER2 testing in gastric cancer: results of a German expert meeting[J]． Journal of Cancer Research & Clinical Oncology，2017，143（5）：835-841．
[16] Güttlein L N，Benedetti L G，Fresno C，et al． Predictive Outcomes for HER2-enriched Cancer Using Growth and Metastasis Signatures Driven By SPARC[J]． Molecular Cancer Research Mcr， 2017，15（3）：304．
[17] Ozbay T，Nahta R．Delphinidin Inhibits HER2 and Erkl/2 Signaling and Suppresses Growth

of HER2-Overexpressing and Triple Negative Breast Cancer Cell Lines[J]. Breast Cancer：Auckl，2011，5：143-154.
[18] XU Mei，BOWER K A，WANG Siying，et al. Cyanidin-3-glucoside inhibits ethanol -induced invasion of breast cancer cells overexpressing ErbB2[J]. Molecular Cancer，2010，9（1）：285.